

**This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problems Mailbox.**

DERWENT PUBLICATIONS LTD

17  
0/10  
Aug 1978  
1981



② Offenlegungsschrift  
③ DE 29 44 138 A1

④ Inv. Cl. 2:  
G 01 N 35/08



⑤ Anmelder:  
Technicon GmbH, 6368 Bad Vilbel, DE

P 29 44 138 1 52  
2 11 79  
11 6 81

⑥ Erfinder:  
Asmann, Prof. Dr med., Gord. Hellb. Dr rer. nat.,  
Horst Oertel, 4400 Münster, DE; Specht, Dipl. Chem.  
Dr rer. nat., Werner, 3410 Uslar DE; Weber, Dipl. Phys.,  
Rainer, 6368 Niederdorfelden, DE

DE 29 44 138 A1

Patent  
Reichel  
6101  
1981

TECHNICON

1. Verfa  
Analysens  
Durchflus  
d a d u r  
daß man d  
tenen oder  
Inkubatio  
führen. A  
Probenstr  
durch Abs  
einen all

2. Verfa  
Lipoprote  
Über die  
d a d u r  
daß man au  
aus Phosph  
Density-Li  
ausfällt,  
tion den a  
bleibenden  
und der er

Prüfungsantrag gem. 144 ParG ist gestellt.

⑦ Verfahren und Vorrichtung zur Durchführung von Analysen in automatischen Analyseensystemen unter Abtrennung von Rührerschlägen

1011

DE 29 44 138 A1

BUNDES PATENTBLATT 20.09.1981 Seite 69

WE.C.P.  
G 01 N 38/08

DE 294138 A1

M. Dr. med. phil.  
Seelze, Ost. Chem.  
E. Weiser, Ost. Phys.

Patentanwälte  
Reichel u. Reichel  
8 Frankfurt a. M.  
Panknitzstr. 13

9165

2944138

TECHNICON GMBH, 6368 Bad Vilbel-1

Patentansprüche

1. Verfahren zur Durchführung von Analysen in automatischen Analysensystemen, die nach dem Prinzip des kontinuierlichen Durchflusses arbeiten, unter Abtrennung von Niederschlägen, dadurch gekennzeichnet, daß man den in einer zu analysierenden Flüssigkeit enthaltenen oder in ihr erzeugten Niederschlag - ggf. nach einer Inkubationszeit - in einem horizontal und geradlinig geführten Abschnitt eines gleichmäßig mit Luft segmentierten Probenstroms absitzen läßt, den sedimentierten Niederschlag durch Absaugen entfernt und aus dem verbleibenden Probenstrom einen aliquoten Teil zur Analyse entnimmt.
2. Verfahren nach Anspruch 1 zur Bestimmung von High-Density-Lipoproteinen (HDL), insbesondere in Körperflüssigkeiten, über die Messung des Cholesteringehalts, dadurch gekennzeichnet, daß man aus der verdünnten Probe durch Zusatz eines Reagens aus Phosphorwolframsäure und Magnesiumchlorid die Very-Low-Density-Lipoproteine (VLDL) und Low-Density-Lipoproteine (LDL) ausfällt, die Probe anschließend inkubiert, nach Sedimentation den abgesetzten Niederschlag absaugt und aus dem verbleibenden Flüssigkeitsstrom einen aliquoten Teil entnimmt und der enzymatischen Cholesterinanalyse zuführt.

130024/0034

4138

- 2 -

2944138

3. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1 mit durch eine Förderpumpe -öffbaren und für den Durchfluß freigebaren Zuflührungsleitungen für Waschflüssigkeit, Luft, Probe und Reagenzien, einem Probennehmer, der von einem Probenteller Anteile der zu untersuchenden Flüssigkeit und Waschflüssigkeit in die Probenzuflührungsleitung eingibt, einer Einmündung der Luftleitung in die Probenleitung, einer stromabwärts davon angeordneten Einmündung einer Reagenzienleitung in die Probenleitung, einer davon stromabwärts angeordneten Mischspirale mit Heizbad sowie einem Photometer und einem Registriergerät, daß durch gekennzeichnet, daß zwischen den Einmündungen von Luft- und Reagenzienleitung, ggf. nach der Einmündung einer Füllungsreagenzleitung und bzw. oder Einschaltung einer Mischspirale (5) zur Inkubation der Ausfüllung, eine aus horizontal und geradlinig verlaufenden Leitungsschnitten bestehende Sedimentationsschlange (6) mit einem Auslaß für den Niederschlag (8) und einem Auslaß für die überstehende Flüssigkeit (A) vorgesehen ist.

4. Vorrichtung gemäß Anspruch 3 zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1 oder 2, daß durch gekennzeichnet, daß zwischen der Einmündung der Luftleitung und der Sedimentationsschlange (6) die Einmündung einer Füllungsreagenzleitung und stromabwärts davon daran anschließend eine Mischspirale (5) vorgesehen sind und daß der Abschnitt von der Einmündung der Füllungsreagenzleitung bis zum Ende der Mischspirale (8, 9) aus einem antistatischen Werkstoff, insbesondere Polytetrafluorethylen, besteht oder mit ihm ausgekleidet ist.

130024/0034

4138

- 3 -

2944138

TECHNICON GMBH, 6368 Bad Vilbel-1

Verfahren und Vorrichtung zur Durchführung  
von Analysen in automatischen Analysensystemen  
unter Abtrennung von Niederschlägen

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren und eine  
Vorrichtung zur Durchführung von Analysen in einem konti-  
nuierlichen Fließsystem unter Abtrennung von Präzipitaten,  
die entweder mit der Probe zugeführt werden oder im Verlauf  
einer Reaktion entstehen. Die Analyse wird dann mit einem  
Teil des klaren Überstandes durchgeführt.

Die Erfindung betrifft insbesondere ein Verfahren und  
eine Vorrichtung zur Bestimmung von High-Density-Lipoprotei-  
nen (HDL) über die Messung des Cholesteringehaltes, bei  
dem zuvor die Low- und Very-Low-Density-Lipoproteine (LDL  
bzw. VLDL) ausgetilgt werden müssen.

Die Hypercholesterinämie ist als primärer Risikofaktor  
für das Auftreten der koronaren Herzkrankheiten seit 25  
Jahren bekannt. Jüngste Befunde scheinen allerdings an der  
Allgemeinverbindlichkeit des Gesamt-Serumcholesterinspiegels  
als eines Risikofaktors gewisse Modifikationen erforderlich  
zu machen. In vielfältigen Studien konnte die Bedeutung des  
HDL-Cholesterins nachgewiesen werden. Aufgrund einer Viel-  
zahl von Befunden stellte sich das HDL-Cholesterin - im  
Gegensatz zum Gesamt-Cholesterin - als ein Schutzfaktor  
gegen die koronare Herzkrankheit dar; niedrige HDL-Chole-  
sterinspiegel sind als Risikofaktor für die koronare Herz-  
krankheit anzusehen.

130024/0034

138

- 4 -

2944138

HDL-Cholesterin lässt sich einfach und spezifisch durch eine enzymatische Reaktion mit nachfolgender Farbentwicklung bestimmen, wenn zuvor die anderen Lipoproteine mit geringerer Dichte abgetrennt werden. Aus einer Reihe von Veröffentlichungen geht hervor, daß ein Reagenz aus Phosphorwolframsäure und Magnesiumchlorid spezifisch VLDL- und LDL-Anteile im Serum ausfällt, während HDL in Lösung verbleibt.

Aus der Methodenbeschreibung "HDL-Cholesterin" der Firma Boehringer Mannheim aus dem Jahre 1979 ist ein manuelles Verfahren unter Einsatz des genannten Reagenzes bekannt, das sich aus den folgenden Arbeitsschritten zusammensetzt: Abmessen der Probe, Zusatz einer abgemessenen Reagenzmenge, Mischen des Ansatzes, Inkubation für eine bestimmte Zeit, Zentrifugation für eine bestimmte Zeit mit vorgegebener Leistung, Abnahme des Überstandes, Einsatz eines aliquoten Teils zur Cholesterinbestimmung, Zugabe einer abgemessenen Menge von Cholesterin-Reagenz, Inkubation für eine bestimmte Zeit und fotometrische Bestimmung des entstandenen Farbstoffes.

Aufgabe der Erfindung ist es, eine derartige aufwendige manuelle Arbeitsweise durch ein automatisches Analyseverfahren zu ersetzen, das sich dadurch auszeichnet, daß unabgemessene Proben eingesetzt werden können und keine Pipettier- und Zentrifugierschritte erforderlich sind.

Gegenstand der Erfindung sind das in den Ansprüchen 1 und 2 gekennzeichnete Verfahren sowie die in den Ansprüchen 3 und 4 gekennzeichnete Vorrichtung.

Die Erfindung wird im folgenden an Hand von Zeichnungen näher erläutert, worin

130024/0034

344138

- 5 -

2944138

isch durch  
entwicklung  
t geringe-  
Veröffent-  
orwolfram-  
DL-Anteile  
t.

n° der  
ein manu-  
mizes be-  
zusammen-  
nen Rea-  
ine be-  
zeit mit  
Einsatz  
Zugabe  
Inkuba-  
stimmung

e aufwendig-  
Analysen-  
net, daß  
d keine  
sind.

sprlichen  
en Ansprü-

Zeichnum-

F i g . 1 eine schematische Darstellung des Strömungs-  
verlaufs in einem durch zwei Luftblasen-segmentierten  
Probenabschnitt.

F i g . 2 eine schematisierte Ansicht einer bei der  
erfindungsgemäßen Vorrichtung verwendeten Sedimentations-  
einrichtung und

F i g . 3 ein Fließschema des erfindungsgemäßen Ver-  
fahrens

bedeuten.

Für eine ausreichende Sedimentation in vertretbarer Zeit  
sind zwei Voraussetzungen notwendig, wie sie in dem erfin-  
dungsgemäßen Verfahren verwirklicht sind:

1. Gleichmäßige Luftsegmentierung des Stromes,
2. horizontaler und geradliniger Fluß bei Vermeidung  
jeglicher Störung des Strömungsverhaltens, wie er  
gemäß Abb. 1 zu einer völlig symmetrischen Strö-  
mungsverteilung führt.

Durch die zweiseitige Begrenzung des strömenden Flüs-  
sigkeitssegments mit zwei Luftblasen werden die der Wand  
benachbarten Flüssigkeitsschichten in die Mitte des Segments  
und in Fließrichtung transportiert. Teilchen mit größerer  
Dichte als der der Flüssigkeit reichern sich sehr schnell in  
der unteren Hälfte des Flüssigkeitssegments an. Wird nach der  
Sedimentationsstrecke etwa die Hälfte des Stroms nach unten  
abgesaugt, verbleibt ein fast klarer Überstand. Verbleibende  
Niederschlagsreste setzen sich auf einer zweiten Sedimenta-  
tionsstrecke ab. Zur Analyse wird von oben ein aliquoter  
Teil abgenommen und in bekannter Weise etwa mit einem luft-  
segmentierten Strom aus Analysenreagens in Kontakt gebracht  
und inkubiert, wonach die erhaltenen Farbreaktionen fotometrisch  
ausgewertet wird. 130024/0034

D  
Anspruch  
angewandt  
Probennau  
saugten  
und inklu  
Absaugen  
Mündert s  
rig-fett  
wenn die  
Schluß  
Die Best  
Niedersc  
entsprec

O  
RCC  
Ch

HC

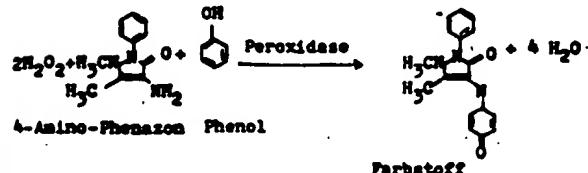
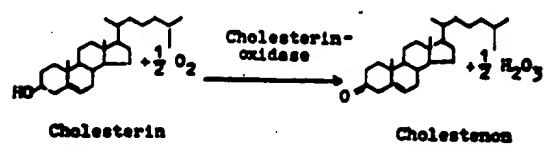
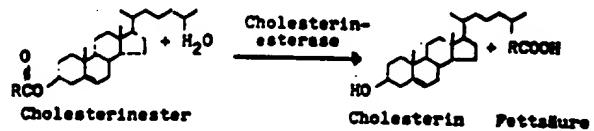
2H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+H<sub>3</sub>C  
H<sub>3</sub>C  
4-Amino-

138

- 6 -

2944138

Das allgemeine Verfahren nach Anspruch 1 wird gemäß Anspruch 2 zur automatischen Bestimmung von HDL-Cholesterin angewandt. Das Verfahren verläuft vollautomatisch von der Probenaufnahme bis zur fotometrischen Auswertung. Die angestuften Proben werden verdünnt, mit Füllungsreagenz versetzt und inkubiert, bevor der Niederschlag nach Sedimentation durch Abseugen entfernt wird. Der Niederschlag der Lipoproteine verändert sich im Verlauf der Inkubation: Anfangs ist er schmierig-fettig und bleibt daher leicht an der Gefäßwandung haften, wenn diese nicht aus antiaadhäsigem Material besteht. Zum Schluß besitzt er jedoch eine fast körnige, feste Konsistenz. Die Bestimmung der Cholesterinkonzentration erfolgt in der vom Niederschlag befreiten Lösung nach einer enzymatischen Reaktion entsprechend den folgenden Gleichungen:



130024/0034

2944138

- 7 -

Die Analysenvorrichtung zur Durchführung der Verfahren gemäß der Erfindung besteht gemäß Fig. 3 beispielsweise aus einem Probennehmer 1, einer Pumpe 2, einer analytischen Einheit, die eine Mischspirale 5, ein Heizbad 7 mit einer weiteren Mischspirale und eine Sedimentationsschlange 6 enthält, sowie einem Einkanal-Durchflussfotometer 3 mit einer Kuvette von 15 mm Länge und 1,5 mm Durchmesser sowie einem Einkanal-Linienschreiber 4. Vorzugsweise sind das Zugabefitting 8 und die Inkubationsschlange 3 aus einem antiadhäsiven Werkstoff, insbesondere Polytetrafluorethylen (PTFE), gefertigt oder mit einem derartigen Werkstoff ausgekleidet, um ein Anhaften der Ausfällungen an der Wand zu vermeiden.

Beispiel

Die Bereitstellung der Proben (Serum) erfolgt in Kunststoffbechern, die sich im Probenteller des Probennahmers befinden. Die Proben werden eine nach der anderen unter Zwischenschaltung von Waschflüssigkeitsabschnitten in einem derartigen Rhythmus angeseaugt, daß das Proben/Waschflüssigkeits-Entnahmeverhältnis 6:1 beträgt und 60 Proben/h verarbeitet werden. (Diese Betriebsweise kann variiert werden.)

Das die Waschflüssigkeit enthaltende Gefäß im Probennahmer wird über die Pumpe 2 mit 2 ml Wasser/min versorgt. Über den in der Pumpe 2 installierten Probenschlauch mit einer Förderleistung von 0,16 ml/min wird das Serum in einem luftsegmentierten Strom von Füllungsreagens mit Netzmittel (1,0 ml/min) über eine Zugabestelle 8 aus Polytetrafluorethylen (PTFE) zudosiert. Der Luftschlauch fördert 0,42 ml Luft/min. Das Füllungsreagens ist wie folgt zusammengesetzt:

0,5 %  
6,25 mM  
20 mM  
pH 7,1  
5 ml Pe

Nach der  
25 Windungen  
schlange 6 :  
schlag 8 wi:  
Überstand w  
Flüssigkeit  
Luft segmen  
der in eine  
optische Di  
Probe entst  
gemessen. S

Wa/Gu

130024/0034

8

- 8 -

2944138

uren  
aus  
Ein-  
rei-  
-  
ter  
m  
-  
-  
-  
inst-  
- 1  
  
ch-  
m/h  
ver-  
  
en-  
gt.  
t  
einem  
tel  
re  
al

0,5 % Phosphorwolframsäure  
6,25 mM Magnesiumchlorid  
20 mM Natriumhydroxid  
pH 7,1  
5 ml Polyoxyethylenlaurylther (Brij 35) pro 1000 ml

Nach der Inkubation in der PTFE-Mischspirale 5 mit 25 Windungen fließt der Strom durch die Sedimentations-Schlange 6 mit 1 Windung (Fig. 2). Der angereicherte Niederschlag 8 wird mit 0,8 ml/min nach unten abgesaugt. Aus dem Überstand wird am Ende mit 0,16 ml/min ein Teil A der Flüssigkeit und der Luftblasen abgenommen und einem mit Luft segmentierten Strom aus Cholesterinreagens zugesetzt, der in einer Heizschlange bei 37 °C inkubiert wird. Die optische Dichte des in der enzymatischen Reaktion mit der Probe entstehenden Farbstoffes wird im Durchflussfotometer 3 gemessen. Das Ergebnis erscheint auf dem Schreiber 4.

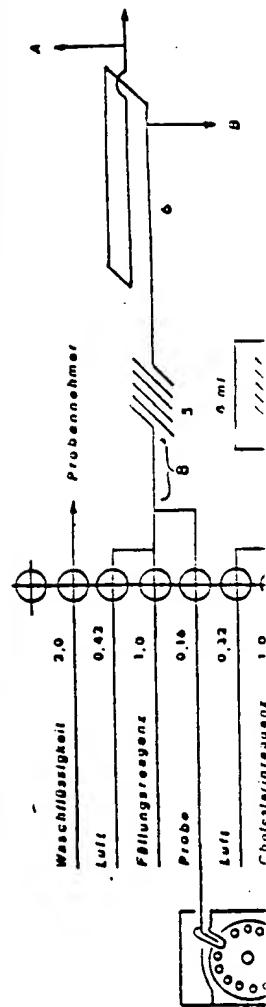
Va/Os

130024/0034

DERWENT PUBLICATIONS LTD.

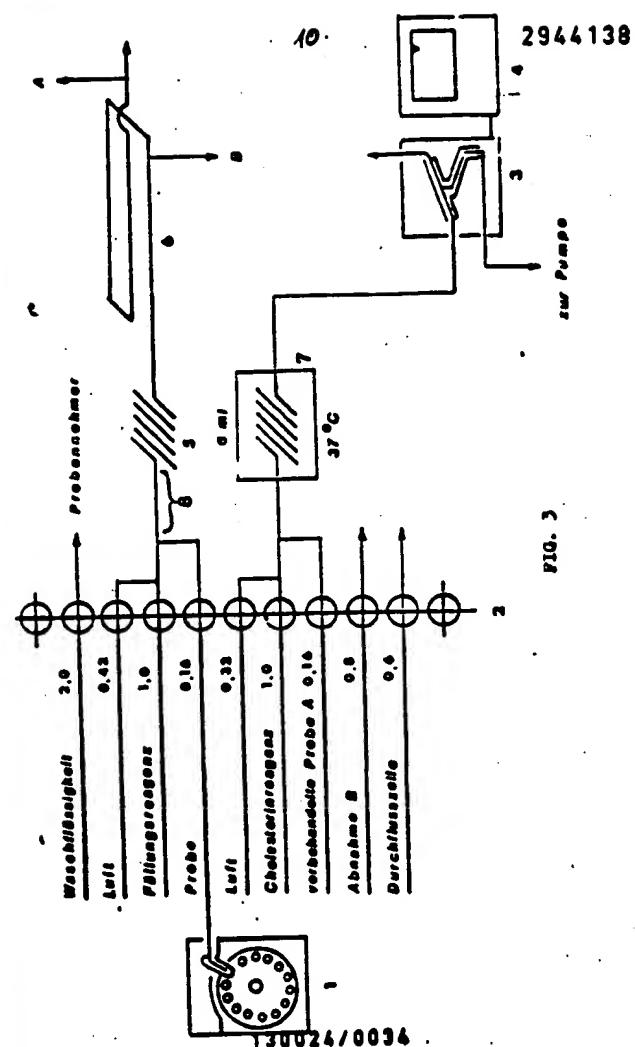
DERWENT PUBL

Leerseite



**DERWENT PUBLICATIONS LTD.**

**DERWENT PUE**



DERWENT PUBLICATIONS LTD.

DEI

4138

41.

2944138

DE 196  
H. G.  
Anmeldetag:  
Offenlegungstag:

D 41 000  
0010 200  
2. November 1970  
11. Juni 1971



FIG. 1

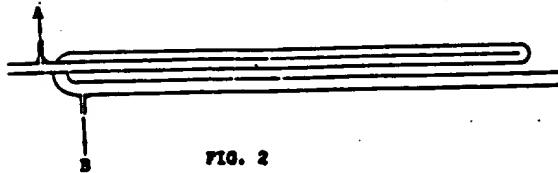


FIG. 2

130024/0036

BUNDESRE  
DEUTSCHE



DEUTSCHE  
PATENT

Anmelder:  
AGS Ausgabe  
Gesellschaft für  
DE

• Verfahren •